

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**“IDENTIFICACIÓN DE LA MICROFLORA BACTERIANA
RUMINAL DE LA ALPACA (*Vicugna pacos*) MEDIANTE
ANÁLISIS DEL GEN 16S RDNA.”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Carolina Yolanda Rodriguez Wong

Lima – Perú

2012

Sabemos que Dios va preparando TODO para el bien de los que lo aman...

Conociendo esta verdad,
va mi infinito agradecimiento a cada una de las personas que me animaron, alentaron,
empujaron y presionaron a terminar este proyecto.
Esto tiene un poco de todos ustedes pues cada vez que mis fuerzas y ganas se terminaban
ustedes estuvieron allí para que no renuncie...

A Dios

A mi esposo y a mis hijas razones para ser mejor cada día.

A mi papá y mis hermanos por haberme animado y apoyado durante todo este tiempo.

Al Dr. Fernando Carcelén por la oportunidad de concretar este proyecto.

Al Dr. Jorge Rodríguez por el apoyo académico siempre disponible.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE ANEXOS	v
I. INTRODUCCION	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
1. Alpaca	
1.1. Distribución.....	3
1.2. Taxonomía	3
1.3. Importancia	3
2. Microflora gastrointestinal	
2.1. Importancia	5
2.2. Bacterias.....	6
2.2.1. Clasificación bacteriana.....	6
2.2.2. Estructura y componentes bacterianos.....	6
A. Pared celular, capsula y membrana.....	6
B. Ribosoma bacteriano	7
C. Cromosoma bacteriano	7
D. Gen 16S ARNr.....	8

2.3. Métodos de Identificación bacteriana	
2.3.1.Cultivo microbiológico.....	8
2.3.2.Pruebas bioquímicas	9
2.3.3.Identificación molecular	9
3. Técnicas moleculares	
3.1. Extracción de ADN.....	10
3.2. Reacción en cadena de la polimerasa.....	11
3.3. Clonamiento molecular.....	13
3.4. Secuenciamiento de ADN.....	17
3.5. Análisis del gen 16S ARN ribosomal	19
 III. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Materiales	
1.1. Localización	20
1.2. Animales.....	20
1.3. Materiales	20
1.4. Equipos.....	21
2. Metodología	
2.1. Toma de muestras.....	22
2.2. Extracción y cuantificación de ADN.....	22
2.3. Amplificación del gen 16S ARNr	23
2.4. Clonamiento al azar y secuenciamiento del gen 16S rDNA bacteriano	23
2.5. Análisis de secuencias del gen 16S rRNA bacteriano	24
 IV. RESULTADOS	
1. Toma de muestras	25
2. Extracción y cuantificación de ADN	25
3. Amplificación del gen 16S ARNr mediante PCR	26
4. Clonamiento del gen 16S ARNr bacteriano	27
5. Analisis de secuencias del gen 16S ARNr e identificación bacteriana.....	29

V.	DISCUSION	31
VI.	CONCLUSIONES	35
VII.	RECOMENDACIONES	36
VIII.	BIBLIOGRAFIA	37
IX.	ANEXOS	44

RESUMEN

El presente estudio se dirigió a la identificación molecular de bacterias presentes en el compartimiento 1 de alpacas Huacaya mediante secuenciamiento del gen 16S rRNA. ADN genómico bacteriano fue extraído a partir de licor ruminal de 4 alpacas adultas de la raza Huacaya. Fragmentos de 728 bases del gen 16S rDNA fueron amplificados mediante PCR y clonados en un vector de expresión PGEM-T (Promega), transformados en *Escherichia coli* JM109 y secuenciados en un analizador genético ABI 3130. Cincuenta clonas fueron secuenciadas dando como resultado un total de 24 secuencias únicas del gen 16S ARNr. El análisis de las 24 secuencias únicas indicaron altos grados de identidad ($> 95\%$, $> e-140$) con secuencias de bacterias previamente descritas en bases de datos del GeneBank, Blast server for bacterial identification, Ribosomal data base Project y BiBi database. Los resultados indican la presencia de *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus bromi*, *Clostridium thermocellum*, *Succiniclasicum ruminis*, *Sporobacter mitidis*, *Fastidiosipila sanguinis* en el compartimiento 1 de la alpaca.

Palabras clave: alpaca, compartimiento 1, bacteria, 16S ARNr

ABSTRACT

The present study aimed to identify bacteria from the alpaca compartment 1 by sequencing and analysis of 16S rRNA gene. Bacterial genomic DNA was extracted from ruminal fluid from 4 adult Huacaya alpacas. PCR amplification of 16S rRNA gene fragment (728 bp) was realized, PCR product were cloned in PGEM-T vector plasmid (Promega), transformed in *Escherichia coli* JM109 and both strands sequencing in ABI 3130 Genetic Analyzer. Fifty clones were sequenced and 24 unique 16S rRNA gene sequences were founded. Analysis of 24 unique 16S rRNA gene sequences showed high identity levels (> 95%, > e-140) with bacterial DNA previously described in Gene bank database, Blast server for bacterial identification, Ribosomal database project and BiBi database. The results indicate the presence of *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus bromi*, *Clostridium thermocellum*, *Succiniclasicum ruminis*, *Sporobacter mitidis*, *Fastidiosipila sanguinis* in the alpaca compartment 1.

Keywords: alpaca, compartment 1, bacterium, 16S rRNA gene

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01: Estructura del ribosoma bacteriano
- Figura 02: Etapas en la extracción de ADN.
- Figura 03: Etapas de la Reacción en cadena de la polimerasa.
- Figura 04: Etapas del clonamiento molecular.
- Figura 05: Plásmido pGEM -T Easy Vector.
- Figura 06. Termino de la cadena bajo la incorporación de un dideoxinucleósido trifosfato.
- Figura 07: Método de secuenciamiento de Sanger.
- Figura 08: Pellet bacteriano obtenido mediante centrifugación a 6000 g durante 3 minutos.
- Figura 09: Extracción de ADN genómico bacteriano a partir de licor ruminal (dilución 1:10).
- Figura 10: Amplificación de PCR del gen 16S rDNA a partir de ADN bacteriano proveniente de contenido cecal.
- Figura 11: Clonamiento de productos de PCR del gen 16S ARNr. Cultivo de *E. coli* JM109 de 24 horas.
- Figura 12: Técnica de selección mediante cultivo en medio LB (Luria Broth) con ampicilina y a - complementación de (3-galactosidasa mediante el uso de análogos de glucosa X-Gal e IPTG (método de selección azul y blanca).
- Figura 13: Cromatograma de la secuencia del gen 16S ARNr de *Succiniclasicum ruminis*.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Número de clonas y especies bacterianas identificadas mediante análisis de 3 bases de datos de secuencias del gen 16S ARNr.

Cuadro 2. Especies bacterianas identificadas, número de secuencias, porcentaje de identidad y valor estadístico E (e-value).

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 01. Protocolo para extracción de ADN utilizando el Kit Qiagen
- ANEXO 02. Protocolo de Amplificación del Gen Bacteriano 16S ARNr
- ANEXO 03. Protocolo de clonamiento y transformación bacteriana
- ANEXO 04. Arboles filogenéticos obtenidos para bacterias identificadas

I. INTRODUCCION

El Perú posee la mayor población de alpacas a nivel mundial, con cerca de 3 millones de alpacas (FAO, 2005) distribuidas principalmente en zonas alto andinas sobre los 3500 metros de altitud. Los sistemas de producción de alpacas están constituidos principalmente por pequeños y medianos productores (cerca del 90%) (FAO, 2005) para los cuales la venta de fibra de alpaca constituye un importante recurso económico para la manutención de sus familias.

La identificación de la microflora bacteriana constituye el primer paso para la caracterización de cepas bacterianas con potenciales usos biotecnológicos. La identificación de los microorganismos presentes en la microbiota gastrointestinal se basa en la amplificación y secuenciamiento de regiones genómicas conservadas en bacterias, como los genes 16S ARNr y 18S ARNr, y secuenciamiento mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de secuenciamiento.

El análisis de comunidades microbianas en diferentes ambientes y condiciones, permite determinar los genes presentes así como sus funciones y la comparación entre microorganismos. Esto se torna importante debido al problema medioambiental ocasionado por la considerable producción de desechos por parte de los sistemas de producción animal. El 23% de las emisiones globales son metano y éstas contribuyen a producir el efecto invernadero, siendo el 73% son producidas por los rumiantes. La presencia de bacterias de alta capacidad celulolítica en el rumen de ganado vacuno ha permitido identificar y aislar enzimas que favorecen la digestibilidad de ciertos nutrientes (Zoetendal y col., 2004; Makkar y McSweeney, 2005).

La alpaca a diferencia de los rumiantes domésticos presenta una mayor digestibilidad de los forrajes con altos niveles de celulosa, siendo el compartimiento 1, la cámara de fermentación donde ocurren estos procesos biológicos. La constitución particular de la microflora bacteriana en el

compartimiento 1 de la alpaca constituye una fuente de bacterias celulolíticas con potencial biotecnológico. La caracterización molecular de la microflora bacteriana se ha realizado con éxito en diferentes especies domésticas, como perros (Vanhoutte y col., 2005), conejos (Linaje y col., 2004) y ganado bovino (Tajima y col., 1999), sin embargo se carece de suficientes reportes sobre especies bacterianas presentes en el compartimiento 1 de la alpaca (*Vicugna pacos*).

El objetivo del presente estudio ha sido identificar especies bacterianas presentes en la microflora del compartimiento 1 en alpacas (*Vicugna pacos*) mediante el análisis de secuencias del gen 16S ARNr.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

1. ALPACA (*Vicugna pacos*)

1.1 Distribución

La alpaca (*Vicugna pacos*) es un mamífero ungulado que habita en las zonas alto andinas de Sudamérica comprendiendo los países de Colombia, Ecuador, Perú, Chile, Bolivia y Argentina (FAO, 2004). El Perú posee la mayor población de alpacas a nivel mundial, con cerca de 3 millones de alpacas (CONACS, 2003; FAO, 2005) distribuidas principalmente en zonas alto andinas sobre los 3500 metros de altitud. En el Perú, la crianza de alpacas se distribuye desde Cajamarca y el norte del Departamento de Ancash, hasta Puno (FAO, 2004).

1.2 Taxonomía

La alpaca se clasifica dentro del Reino Animalia, Phylum Chordata, Clase Mamalia, Orden: Arthiodactila, Suborden: Tylopoda, Familia Camelidae, Genero *Vicugna*, Especie *Vicugna pacos*.

Los miembros del orden Arthiodactila se caracterizan por presentar cascos divididos que simulan un par de dedos. Los artiodáctilos están actualmente compuestos por 3 subórdenes conocidos: Suiformes, Tylopodas y Rumiantes. En la actualidad los únicos representantes del Suborden Tylopoda son los miembros de la Familia Camelidae, la cual comprende a los camélidos sudamericanos (alpaca, vicuña, guanaco y llama) y a los camélidos del viejo mundo (camellos y dromedarios).

1.3 Importancia

La alpaca constituye una especie animal de alta importancia socioeconómica para el poblador alto andino. Los principales productos originados de la crianza de alpacas son la fibra y en menor

importancia la carne (CONACS, 2003). El Perú es considerado como el principal productor de fibra de alpaca en el mundo, con un 85% de la producción nacional orientada al mercado internacional (FAO, 2005). Sin embargo, los sistemas de producción de alpacas están constituidos principalmente por pequeños y medianos productores (cerca del 90%) (FAO, 2005) para los cuales la venta de fibra de alpaca constituye un importante recurso económico para la manutención de sus familias.

2. MICROFLORA GASTROINTESTINAL

La colonización del tubo digestivo por parte de los microorganismos se inicia tempranamente, a las primeras horas post-nacimiento, siendo la principal fuente la madre y su medio ambiente (Salminen y col., 1999). La comunidad microbiana intestinal indígena juega un papel importante en términos de transformación de nutrientes, así como en el apoyo a la respuesta contra la colonización con potencial patógenos (Bauer, 2005).

La microflora gastrointestinal se clasifica en microbiota indígena y microbiota transitoria. La microbiota indígena está constituida por microorganismos que se encuentran permanentemente en individuos adultos sanos colonizando determinados nichos ecológicos y asociada íntimamente al epitelio gastrointestinal mientras que la microbiota transitoria está constituida por microorganismos que se encuentran en ciertas etapas en la vida de un individuo sano, su presencia y relación con el ecosistema y epitelio gastrointestinal es menor (Rosmini y col., 2004; Berg, 1996).

La microbiota bacteriana gastrointestinal es compleja usualmente contiene entre 500 y 1000 distintas especies microbiales distribuidas en más de 50 diferentes géneros bacterianos en el tracto gastrointestinal de mamíferos. Existen un rol de la microbiota en el desarrollo temprano de sistemas inmune gastrointestinal y sistémico, siendo esta exposición esencial para un apropiado desarrollo de los mecanismos protectores contra enfermedades inflamatorias, auto inmunes y atípicas (Ferguson, 2007).

2.1 IMPORTANCIA

Uno de los aspectos a considerar en el desarrollo de biotecnologías aplicadas a la nutrición animal es la determinación de la microbiota gastrointestinal en animales domésticos. El análisis de comunidades microbianas en diferentes ambientes y condiciones, permite determinar los genes presentes así como sus funciones y la comparación entre microorganismos (Etherton, 2003). Esto se toma importante debido al problema medioambiental ocasionado por la considerable producción de desechos por parte de los sistemas de producción animal.

El 23% de las emisiones globales son metano y éstas contribuyen a producir el efecto invernadero, siendo el 73%) son producidas por los rumiantes. La mitad de la población ganadera se encuentra en países en vías de desarrollo (Asia, África, América Latina y China) y la calidad de los forrajes en estos países es muy baja conllevando a una mayor emisión de metano por unidad producida de leche y carne determinando una mayor contaminación. Una solución a este problema es la mejora en la conversión de forrajes ingeridos por rumiantes en leche y carne.

La excreción de metano producido en el rumen puede representar pérdidas del 8-10% de la energía ingerida dependiendo el tipo de dieta. La inhibición de metano genes, dietas con ácidos grasos poli insaturados, sistemas de vacunación contra metano genes podrían ser alternativas de control para la sobre producción de metano en rumiantes. Muchas bacterias ruminales son seleccionadas por su habilidad para degradar 3,4 dihidrofitato, taninos, transaconitato, nitrotoxinas entre otras. El uso de microorganismos ruminales de cabras de Indonesia en ovinos australianos mejora la capacidad de estos de degradar la hidroxipiridona un metabolito generado por el metabolismo de la toxina mimosina (un aminoácido libre no proteico) que se encuentra en la leguminosa tropical *Leucaena leucocephala* (Schiere y Tamminga, 1996).

La hepatotoxicidad presente en alcaloides pirrolizidínicos encontrados en la planta *Senecio jacobaea* en ganado vacuno y equino, pero no en ovejas es otro ejemplo de la habilidad de ciertos microorganismos como agentes detoxificadores.

2.2 BACTERIAS

2.2.1 Clasificación bacteriana

Las bacterias pueden dividirse en dos grupos principales: Gram positivas y Gram negativas, dicha clasificación se realiza en base a la composición de su pared celular, la cual genera diferentes patrones de color en una tinción con el método de Gram.

Las bacterias Gram positivas adquieren una coloración azul y presentan una pared celular fina compuesta principalmente por peptidoglicano y ácidos teicoicos. Las bacterias Gram negativas adquieren una coloración roja y presentan una pared celular compleja consistente en una membrana externa constituida por una bicapa lipídica y proteica (LPS), un espacio peri plasmático que contiene pequeñas cantidades de peptidoglicanos (Narins, 2003).

2.2.2 Estructura y componentes bacterianos

Dentro de los principales componentes bacterianos podemos mencionar la pared celular, la capsula, la membrana citoplasmática, citoplasma, organelas y cromosoma bacteriano.

A. Pared Celular, Cápsula y Membrana Celular

La pared celular es una estructura rígida que protege a las bacterias del daño mecánico y lisis osmótica, su composición química es variable predominando los peptidoglicanos. La pared celular otorga a las bacterias propiedades de tinción y patogenicidad únicas. La cápsula es una estructura externa definida y adherida fuertemente a la pared celular compuesta de un material extracelular denominado glucocalix principalmente constituido por polisacáridos y polipéptidos.

La membrana citoplasmática es una estructura flexible compuesta de fosfolípidos y proteínas hidrofóbicas en su parte interior e hidrofílica en su parte exterior. El citoplasma constituye el

material acuoso que contiene el cromosoma bacteriano y las organelas, aquí se desarrollan la mayoría de los procesos bioquímicos implicados en el metabolismo y síntesis celular (Narins, 2003).

B. Ribosoma bacteriano

Los ribosomas son organelas complejas, altamente especializadas encargadas de la síntesis de proteínas. Los ribosomas poseen una masa de 2.5×10^6 D y miden aproximadamente 25 nm de largo (Lodish y col., 2000). Los ribosomas bacterianos poseen una tasa de sedimentación de 70 unidades Svedberg (S) y está constituido por 2 subunidades: una subunidad mayor ó 50S y una subunidad menor o 30S (Figura 1).

Cada subunidad es un complejo ribonucleoproteico constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ARN ribosomal (ARNr) específicas. La subunidad 30S contiene el ARNr 16S y 21 proteínas (S1 a S21), la subunidad 50S contiene los ARNr 5S, 23S y 34 proteínas (L1-L34).

C. Cromosoma bacteriano

Las bacterias presentan un genoma constituido por un solo cromosoma constituido por una sola molécula de ADN de doble hebra súper enrollada y asociada a proteínas y ARNr (Dale y Park, 2004; Ness y Knight, 2004). El tamaño del cromosoma bacteriano puede variar entre cientos de Kilobases (Kb) hasta decenas de Megabases (Mb) en caso de bacterias muy complejas (Dale y Park, 2004). Las bacterias no poseen núcleo sin embargo su molécula de ADN se encuentra organizada en una estructura denominada nucleoide (Lodish y col., 2000).

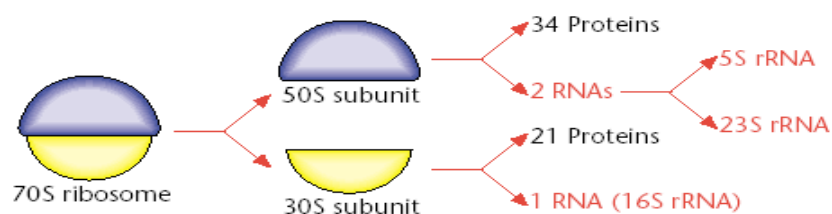


Figura 1. Estructura del ribosoma bacteriano. Modificado de Gu y Reddy (2001)

D. Gen 16S ARNr

Los genes que codifican los ARNr bacterianos están organizados a modo de operones. Los operones constituyen un conjunto de genes que se transcriben a partir de un mismo promotor. Los operones ribosomales están constituidos por los genes que codifican los ARNr 23S, 16S y 5S separados por regiones espaciadoras o intergénicas (IG) y uno o más ARN de transferencia (ARNt). En bacterias los tres tipos de ARNr son transcritos de una larga molécula de ARN, la cual es procesada por corte nucleolítico para liberar ARNr completos y maduros (Gu y Reddy, 2001).

2.3 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

2.3.1 Cultivo microbiológico

El cultivo microbiológico permite la identificación bacteriana a través de las características morfológicas y requerimientos para crecimiento para las diferentes especies de bacterias. La identificación fenotípica bacteriana se basa fundamentalmente en la comparación de las características fenotípicas de bacterias desconocidas con aquellas de cultivos tipo. La fiabilidad de la identificación está en proporción directa al número de características similares. Sin embargo, la gran complejidad de especies presentes en diferentes tipos de ecosistemas como el tracto gastrointestinal de animales y el hombre, así como las diferentes condiciones y requerimientos nutricionales para cultivo no han permitido una completa y correcta caracterización de las especies bacterianas presentes (Pryde y col., 1999; Zoetendal y col., 2004; Derrien y col., 2004).

2.3.2 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas permiten la identificación bacteriana mediante el estudio de características bioquímicas generales presentes en los diferentes sistemas metabólicos bacterianos. La caracterización bioquímica se realiza mediante la identificación de enzimas, sustratos, vías

metabólicas (fermentación), proteínas, productos de secreción-excreción (ácidos grasos, proteínas, etc.) específicos para ciertos géneros y/o especies bacterianas (Derrien y col., 2004).

Existen sistemas de identificación bioquímica disponibles comercialmente para identificación de enterobacterias como los kits BBL, ENTEROTUBE II (Becton Dickinson), OXI/FERM TUBE II, (Becton Dickinson), Quintet 3H y para la identificación de bacterias Gram negativas como el kit API 20 E (Derrien y col., 2004). Sin embargo, los métodos de identificación basados en fenotipo ya sea obtenidos mediante cultivo y análisis bioquímico han demostrado generar resultados variables debido a factores vinculados con la pureza de la bacteria a identificar (Tellez y col., 2006).

2.3.3 Identificación molecular

Los métodos de identificación molecular basados en el análisis de genes conservados en bacterias constituyen un método de elección para la identificación de microorganismos procedentes de diferentes ecosistemas no caracterizados. Actualmente sistemas de identificación basados en el análisis de las secuencias de los genes ribosomales 16S y 23S, gen que codifica la subunidad B de la ARN polimerasa (rpoB), y gen que codifica subunidad B de la ADN girasa o topoisomerasa II (gyrB) vienen siendo utilizados rutinariamente.

Sin embargo, la identificación molecular basada en el análisis del gen 16S ARNr viene siendo la técnica más utilizada (Téllez y col., 2006) debido a: i) que es una molécula ancestral presente en todos los géneros bacterianos, ii) su estructura y función se mantienen constantes a lo largo del tiempo, así como su tasa mutacional es relativamente lenta, iii) la existencia de múltiples y complejas bases de datos de secuencias de dicho gen (alrededor de un millón de secuencias disponibles a la fecha) (Colé y col., 2005).

3. TÉCNICAS MOLECULARES

3.1 Extracción de ADN

El ADN almacena toda la información genética de un organismo y se encuentra en todas las células. La extracción de ADN genómico constituye el primer paso para cualquier técnica posterior en el área de investigación genética, ingeniería genética, diagnóstico, análisis forense, farmacogenética, etc. El ADN extraído puede ser usado para amplificar regiones específicas sobre los 5 Kb de tamaño, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Gauch, 1998; Karcher, 1995; D'Ambrosio y Pascale, 1999).

Todos los métodos de extracción de ADN comprenden cuatro pasos principales: i) la lisis celular que consiste en la ruptura de las membranas celulares por medio de sustancias detergentes (SDS, Guanidín tioacianato) con la consiguiente liberación del contenido celular incluyendo el ADN, ii) la inactivación de nucleasas y desproteinización mediante el uso de proteasas (Proteinasa K), sustancias detergentes y/o sales cao trópicas que permiten mantener la integridad del ADN liberado y la destrucción de la mayor parte del constituyente proteico de las células, iii) la precipitación o captura de ADN mediante alcoholes y sales o el uso de membranas de sílica y finalmente iv) la re suspensión del ADN precipitado para su uso posterior (Figura 2) (D'Ambrosio y Pascale, 1999).

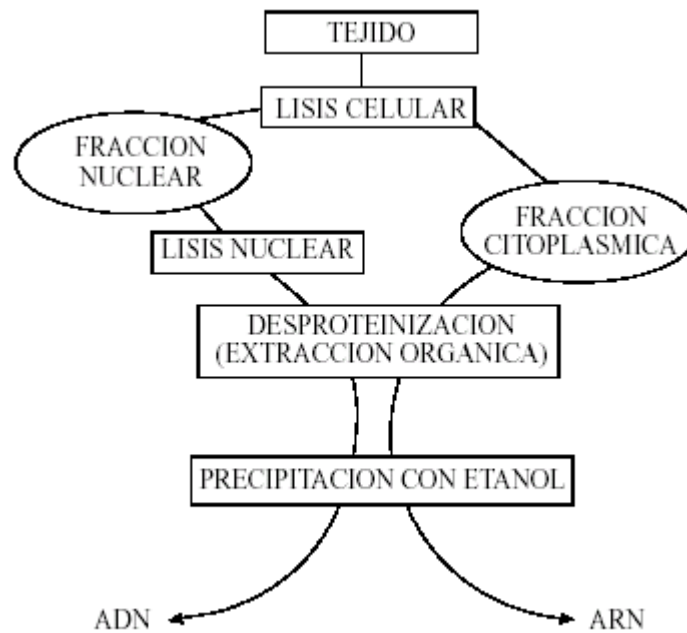


Figura 2. Etapas en la extracción de ADN. Modificado de Robinson y Lafleche (2000).

3.2 Reacción En Cadena De La Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación in vitro de secuencias específicas de ácidos nucleicos. La PCR combina la función in vivo de la ADN polimerasa y produce una amplificación a manera de progresión geométrica exponencial (Brown, 2000). La PCR permite la selectiva amplificación de una específica secuencia blanco dentro de una heterogénea colección de secuencias de ADN, el proceso de amplificación requiere de cantidades mínimas de ADN (microgramos) que pueden ser obtenidos de una simple molécula.

Después de 25 ciclos de síntesis, los productos de PCR incluirán, en adición con el ADN molde, cerca de 105 copias de la específica secuencia blanco, una cantidad que es fácilmente visualizada como una discreta banda de un específico tamaño cuando es corrida en electroforesis en gel de agarosa. Debido a estas razones, la PCR se ha convertido en un versátil procedimiento que tiene aplicaciones en todas las áreas de la investigación en biología molecular, revolucionando la genética molecular debido a que permite un rápido clonamiento y análisis de ADN (Aert y col., 1998).

La PCR consta de 3 etapas: i) la desnaturalización en la cual el ADN de doble hebra es transformado a ADN de simple hebra mediante calentamiento a 94°C., ii) el alineamiento en el cual los oligonucleótidos alinean con sus respectivas secuencias complementarias a ambos lados del gen u otro segmento de ADN que está siendo amplificado, para esto es necesario enfriar la reacción entre 50 -70°C, dependiendo de la T_m (Temperatura de fusión), temperatura en la cual los oligonucleótidos usados se adhieren a sus sitios blanco (Brown, 2000) y finalmente iii) la extensión o síntesis de ADN en la cual la ADN polimerasa termoestable adiciona los deoxinucleosidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la mezcla es calentada a una óptima temperatura para la síntesis de ADN, 70 a 75°C para la Taq polimerasa (ADN polimerasa tipo I, enzima de una bacteria termo tolerante *Thermus aquaticus*) (Brown, 2000).

Los ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión son repetidos de 25 a 30 veces, con un número de moléculas de ADN sintetizado que se dobla durante cada ciclo, esta exponencial amplificación resulta en la síntesis de un gran número de copias de la secuencia de ADN flanqueado por el par de oligonucleótidos (Figura 3).

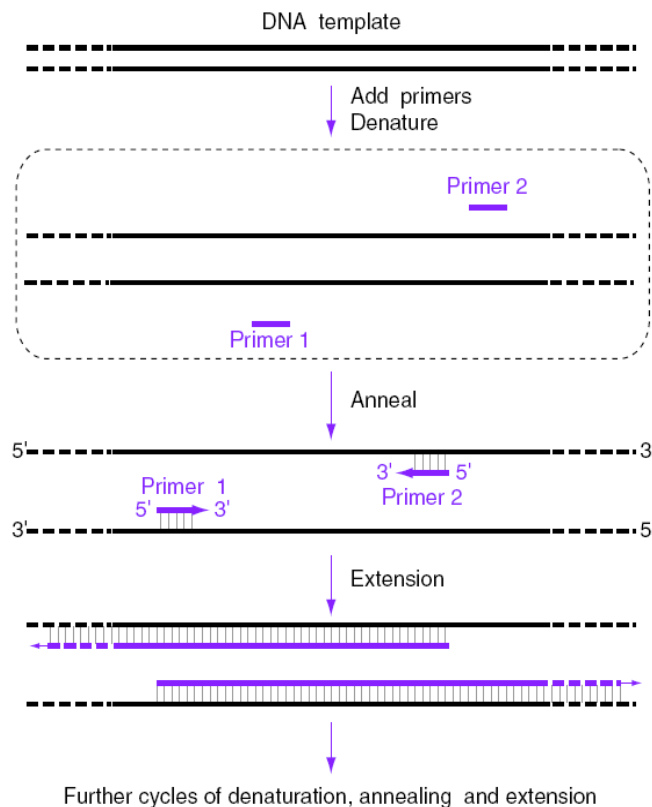


Figura 3. Etapas de la Reacción en cadena de la polimerasa. Modificado de Dale y von Schantz (2002)

3.3 Clonamiento molecular

El concepto de clonamiento molecular en la generación de múltiples copias de un fragmento de ADN mediante su inserción en un vector de clonamiento y su posterior introducción en una célula hospedera para su propagación (Dale J. y von Schantz, 2002; Sambrook y col., 1982). Los vectores de clonamiento son moléculas de ADN que sirven como vehículo de transporte de otra molécula de ADN, a la cual se denomina inserto o ADN foráneo (Sambrook y col., 1982; Klug y Cummings, 1997).

Los vectores de clonamiento pueden ser plásmidos y/o virus. Un vector de clonamientos como un plásmido debe contar con las siguientes características: i) presentar un origen de replicación propio

el cual le confiere la capacidad de replicación independiente del genoma de la célula hospedadora, ii) presentar una región de ADN con sitios de restricción específicos para diferentes enzimas de restricción y iii) presentar marcadores genéticos de seleccionables que permitan identificar las células hospederas en las que se haya introducido el vector (Figura 4), estos marcadores son generalmente genes de resistencia a antibióticos Dale y Von Schantz, 2002).

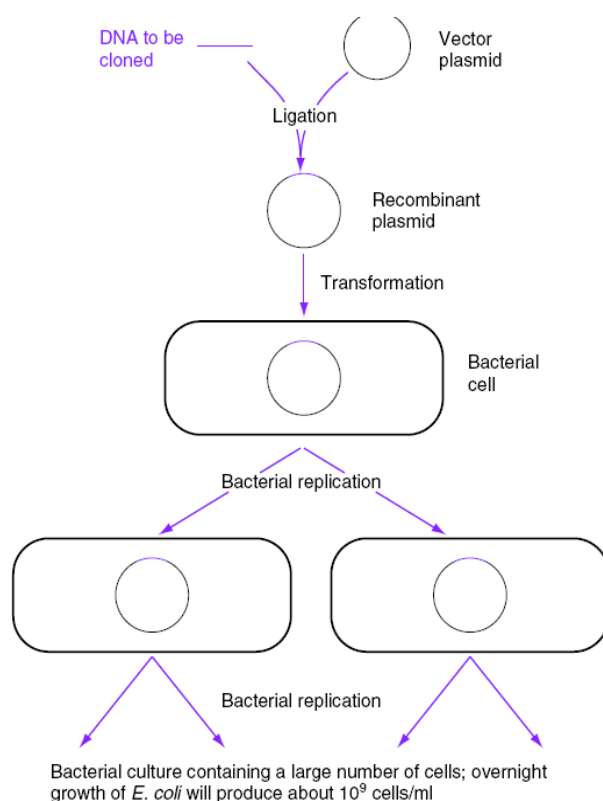


Figura.4.- Etapas del clonamiento molecular. Modificado de Dale y Von Schantz (2002).

Los plásmidos son moléculas de DNA extra cromosómico, circular y generalmente de pequeño tamaño (desde 1 kb a más de 200 kb) que se encuentran en muchas especies bacterianas y que se pueden replicar de manera independiente del DNA cromosómico bacteriano. A diferencia de éste, los plásmidos no son necesarios para la viabilidad general de la célula, pero pueden contener

genes que contribuyen a la supervivencia en condiciones especiales, como los que confieren resistencia a antibióticos, a metales pesados y la producción de enzimas catabólicas, colicinas, enterotoxinas, enzimas de restricción y enzimas de conjugación (Sambrook y col., 1982).

La mayoría de los plásmidos naturales no cumplen todas las condiciones básicas, por lo que una primera tarea de la Ingeniería Genética ha consistido en la construcción de plásmidos artificiales (Figura 5), combinando en una misma molécula diversos rasgos útiles procedentes de los plásmidos naturales actualmente se cuentan con diferentes tipos de plásmidos comerciales para uso en clonamiento molecular (Klug y Cummings, 1997).

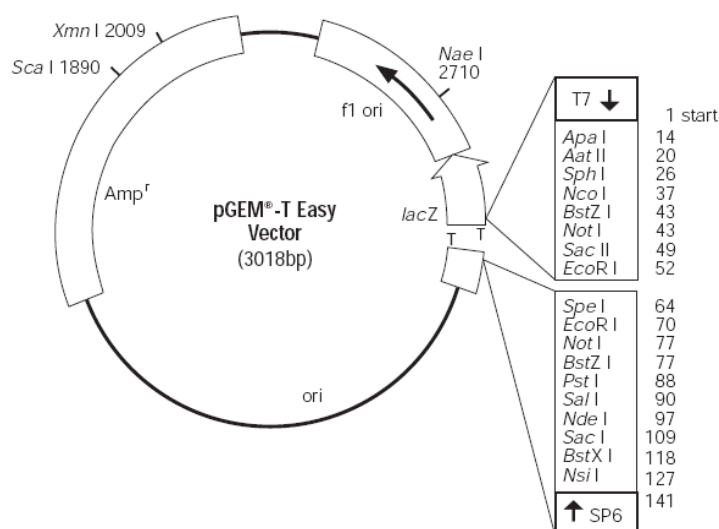


Figura 5. Plásmido pGEM®-T Easy Vector Modificado de Klug y Cummings, 1997.

La primera etapa en el clonamiento molecular es la ligación, en esta etapa un fragmento de ADN es introducido en un vector de clonamiento, la reacción de ligación se basa en la formación de enlaces fosfodiéster y se cataliza por la enzima ADN ligasa (Klug y Cummings, 1997). Una vez producida la ligación se requiere la introducción del vector de clonamiento que lleva el fragmento de ADN (inserto) en una célula hospedadora, esta segunda etapa se denomina transformación. Las células hospedadoras son células que presentan una facilidad de incorporar vectores de clonamiento, la mayoría han sido diseñadas genéticamente a partir de *Escherichia coli* (Dale y von Schantz, 2002).

Entre las células hospederas más utilizadas tenemos: XL1-Blue (pBluescriptII y ZAP II), JM109 (plásmidos derivados del pUC), Y1090 (gt11) y DH5 (M13, derivados del pUC). La tercera etapa consiste en la selección de clones recombinantes (clones que llevan el vector recombinante), este proceso de selección puede realizarse mediante: i) observación de la activación de un gen de resistencia a antibióticos, en el caso del vector pGEMT la activación del gen de resistencia a ampicilina (gen β -lactamasa) el cual permite seleccionar las bacterias que portan estos plásmidos, gracias a su capacidad para crecer en presencia de dicho antibiótico (Sambrook y col., 1982), ii) por la inactivación de la actividad de (β - galactosidasa, el cual se encuentra en el sitio de clonación múltiple lo cual permite la interrupción e inactivación de este gen cuando un inserto de ADN se clona en esta región (Sambrook y col., 1982).

En medios de cultivo que contengan un análogo de la lactosa (X-gal), las bacterias que reciben el vector recombinante no pueden utilizar lactosa ni su análogo y formará colonias blancas a diferencia de las bacterias que reciben un vector no recombinante sí pueden utilizar la lactosa o su análogo formando colonias azules (Klug y Cummings, 1997; Sambrook y col., 1982).

3.4 Secuenciamiento de ADN

El secuenciamiento de ADN determina el orden de las bases de un segmento específico de ADN. Las técnicas de secuenciamiento se basan en el método de síntesis enzimática o método de Sanger. La técnica de secuenciamiento de Sanger se basa en la propiedad de la ADN polimerasa de sintetizar una copia complementaria de una cadena simple de ADN molde a partir del uso de 2-3 - dideoxynucleótidos (ddNTPs) como substratos.

Los ddNTPs son análogos de nucleótidos que carecen de un OH en el Carbono 3 (C3), los cuales una vez incorporados en la nueva cadena de ADN, la polimerasa no puede incorporar bases adicionales al extremo de la cadena, deteniéndose la reacción de síntesis (Figura 6 y 7). En esta técnica los dideoxynucleótidos actúan como terminadores de la síntesis de ADN (Hardin, 2001; Wilton, 2002).

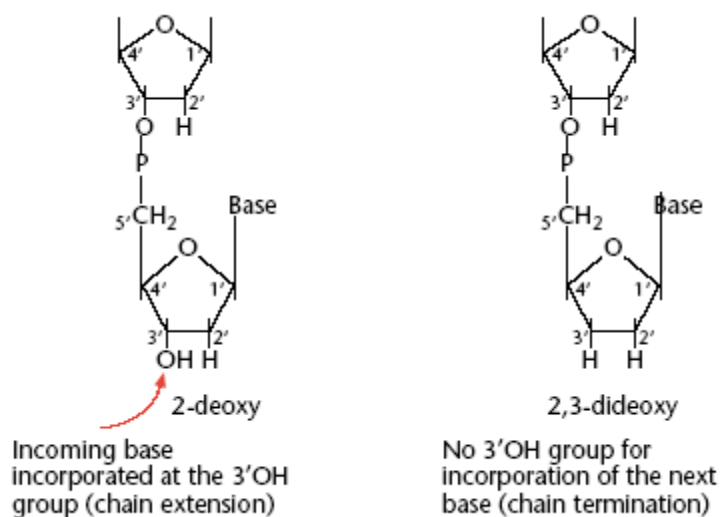


Figura 6. Terminación de la cadena bajo la incorporación de un dideoxinucleósido trifosfato.

Modificado de Wilton (2002)

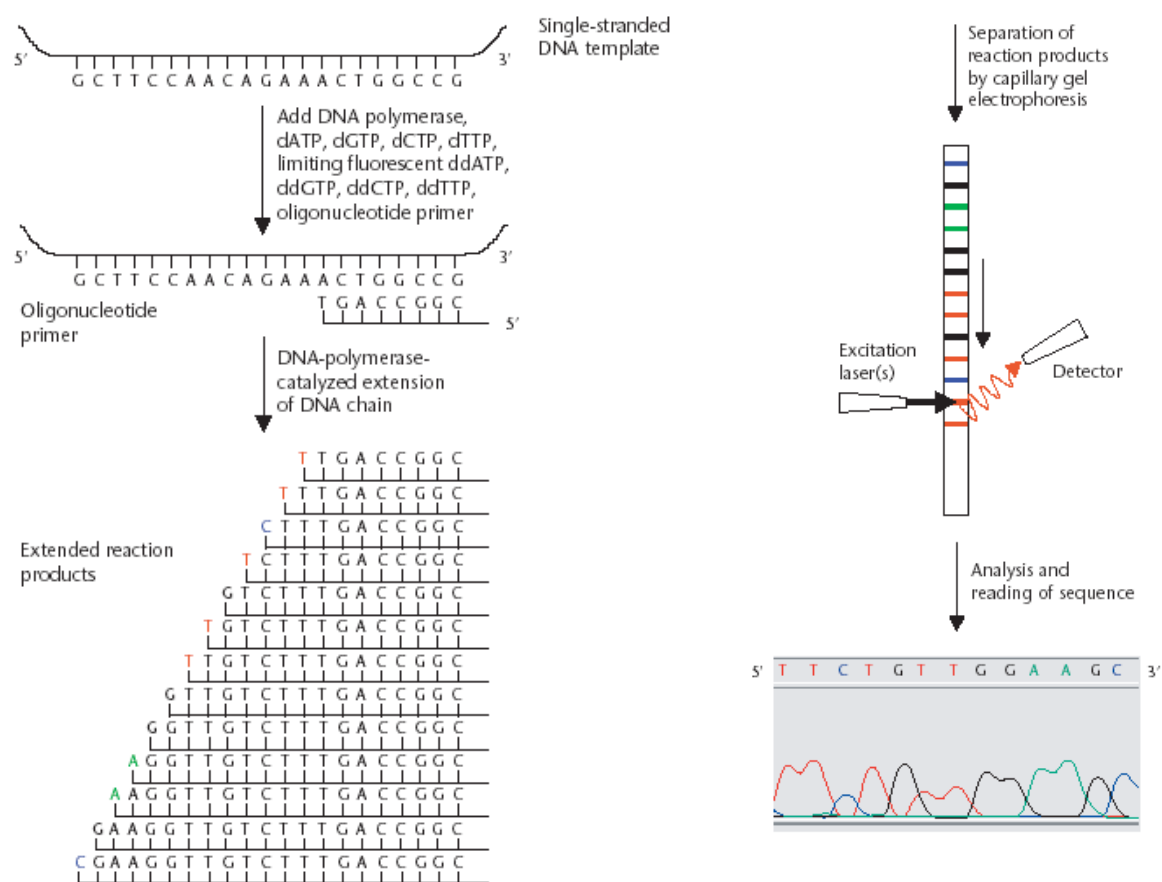


Figura 7. Método de secuenciamiento de Sanger. Modificado de Dunham (2005)

3.5 *Análisis del gen 16S ARN ribosomal*

El 16S ARNr es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.542 nucleótidos, codificado por el gen 16S ARNr. El número de copias del operón ribosómico por genoma bacteriano varía considerablemente encontrándose entre 1 y 15 copias. El ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla.

El gen 16S ARNr es altamente conservado, presentando regiones conservadas comunes a todos los géneros bacterianos alternados de regiones variables altamente específicas para la identificación de especies bacterianas (Téllez y col., 2006) debido a esto es posible amplificarlo mediante el uso de cebadores universales para todos los géneros bacterianos a partir de las regiones conservadas.

Las regiones filo genéticamente informativas para la identificación bacteriana se encuentran en las primeras 500 bases del extremo 5' del gen (Tang, 2000; Patel, 2001). Actualmente existen bases de datos públicas y privadas, que almacenan información de secuencias del gen 16S ARNr como GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), MicroSeq (Applied Biosystems) y SmartGen e IDNS (Integrated Database Network System), siendo RDP (Ribosomal Data Project) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>) la principal base de datos de secuencias de genes ribosomales (16S, 23S, 18S y 28S) (Patel, 2001; Tang, 2000).

Sin embargo, solo la comparación de genomas completos, y no la comparación de fragmentos y/o gen 16S ARNr completo aportan información exacta acerca de las relaciones evolutivas e identificación bacteriana. Taxonómicamente, se define una especie bacteriana como el conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% o más, en experimentos de re asociación ADN-ADN e identidad mayor del 97% (Stackebrandt y Goebel, 1994).

III. MATERIALES Y METODOS

1. Materiales

1.1. Localización

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal, Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria - Universidad Nacional Mayor de San Marcos, las cuales se ubican en el distrito de San Borja y el Laboratorio de Biología del Instituto Peruano de Energía Nuclear ubicado en Huarangal - Carabayllo.

1.2. Animales

Se utilizaron cinco alpacas (*Vicugna pacos*) Huacaya macho clínicamente sanas, adultas fistuladas a nivel ruminal y alimentadas con heno de alfalfa.

1.3. Materiales

- Gasa Estéril
- Equipo de disección
- Guantes de látex estériles
- Bolsas de hielo en cubos y hielo picado
- Jeringas y agujas descartables
- Tubos Falcón de 15 y 50 MI
- Solución de lavado (Cloruro de sodio 0.09%, Twin 20 al 0.05%)
- Matraz de 500 mL
- Beakers de 500 mL
- Pipetas Pasteur

- Embudo
- Gradillas
- Puntas estériles de 1 ml, 200 microlitros
- Micropipetas de 100 a 1000 microlitros, de 20 a 100 microlitros y de 2 a 20 microlitros
- Agua des ionizada auto clavada
- PCR Multiplex kit (Qiagen)
- HotStar DNA polimerasa (Qiagen)
- dNTPs set (Qiagen)
- Tubos de microcentrifuga de 1.5 mL
- Agarosa (Promega)
- pGEMT easy vector (Promega)
- Medio de cultivo Luria Broth
- Ampicilina
- BigDye sequencing kit (Applied Biosystems)

1.4. Equipos para el procesamiento de muestras

- Centrifugas para tubos de 50 mL y 15 mL
- Microcentrifugas para tubos de 1.5 mL
- Vortex
- Termociclador
- Incubadora de placas
- Equipo Baño María
- Analizador genético ABI 3130

2. Metodología

2.1. Toma de Muestras

Quinientos mililitros de contenido del compartimiento 1 fueron colectados de cinco alpacas fistuladas. El contenido fue mezclado y se procedió a realizar un tamizado utilizando gasa estéril para obtener aproximadamente 250 mL de licor ruminal. El licor ruminal fue diluido a razón de 1 en 10 con una solución de lavado (Cloruro de sodio al 0.09% y Tween 20 al 0.05%). La dilución fue colocada en tubos Falcón de 15 mL y se procedió a centrifugar 2 veces el filtrado a 6000 G durante 30 minutos. El precipitado bacteriano obtenido fue colocado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se almaceno a -20 grados centígrados hasta su procesamiento.

2.2. Extracción y cuantificación de ADN bacteriano

El ADN genómico bacteriano se extrajo a partir de 200 µl del precipitado (pellet) bacteriano mediante Qiamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 01). El ADN extraído se colocó en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL de capacidad y se almacenó a -20° C. Se determinó la calidad y concentración del ADN obtenido mediante espectrofotometría utilizando un equipo NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) y comparación con diluciones seriadas de un marcador de peso molecular (fago lambda digerido con la enzima de restricción *Haemophilus influenzae* Rd) λ DNA Hind III® (FERMENTAS) en un gel de agarosa al 1.0 %.

La cuantificación se realizó en ng/µl basada en la medición de la absorbancia a 260 nm (Ley de Beer-Lambert). La calidad del ADN fue analizada a través del ratio de la absorbancia a 260/280; (1.8 es aceptado como ADN puro) y a 260/230 (1.8-2.2 ADN libre de contaminantes). Finalmente, el ADN genómico se diluyó hasta una concentración de 20 ng/µL.

2.3. Amplificación del gen 16S ARNr

Cincuenta nano gramos de ADN genómico bacteriano fue utilizado para amplificar una región altamente conservada de 728 pares de bases del gen 16S ARNr mediante PCR utilizando los cebadores universales descritos para bacterias: P3-Mod (5' CGCGCCGCATTAGATACCCTDGTAGTCC 3'; *Escherichia coli* posición 787 hasta 814) y PC5 (5' GCGGCCGCTACCTTGTTACGACTT 3'; *Escherichia coli* posición 1515 hasta 1492) descritos por Pryde y col., (1999). Las condiciones utilizadas en la PCR así como los ciclos termales utilizados fueron similares a las descritas por Pryde y col., (1999) (Anexo 2).

2.4. Clonamiento al azar y secuenciamiento del gen 16S rDNA bacteriano

Los productos de PCR se purificaron utilizando Wizard PCR Product Purification Kit (Promega) y posteriormente fueron clonados dentro de un plásmido vector pGEM-T Vector Plasmid (Promega). La ligación se realizó a 16 °C durante toda la noche seguidos de una transformación en células competentes *Escherichia coli* JM109 (Promega). Para la obtención de clones con insertos, estos fueron tamizados mediante cultivo en medio LB (Luria Broth) con ampicilina y α - complementación de β -galactosidasa mediante el uso de análogos de glucosa X-Gal e IPTG (método de selección azul y blanca). Los clones positivos se seleccionaron después de su crecimiento en caldo Luria Broth con ampicilina.

Los clones positivos (presencia de inserto) fueron transferidos a una placa de cultivo para su almacenamiento. ADN plasmídico de 50 clonas fue extraído mediante Miniprep Plasmid DNA (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 3). La presencia de productos de inserto fue confirmada mediante PCR utilizando los cebadores M13FyM13R.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Los insertos obtenidos de los plásmidos fueron secuenciados en ambas direcciones (5' - 3' y 3' - 5') usando ABI PRISM Big Dye Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit y un analizador genético ABI PRISM 3130 Genetic Analyser®. La edición y alineamiento múltiple de las secuencias se realizó mediante los programas Clustal W y Mega v4.0 (Tamura y col., 2007).

2.5. Análisis de secuencias del gen 16S rRNA bacteriano

Las secuencias de ADN se compararon directamente con las bases de datos del Gen Bank mediante el uso del programa Blast para la identificación de procariontes, RDP Ribosomal database project como la base de datos de ribosomas y BiBi database para identificar el género y especie bacterianos en base a la identidad de la secuencia y el valor de e (e- value) y el origen filogenético (Mignard y Flandrois, 2006).

1. Toma de Muestras

La colección del licor ruminal a partir de contenido del compartimiento 1 de la alpaca se obtuvo sin inconvenientes, obteniéndose alrededor de 250 mL. La adición de una solución de lavado (cloruro de sodio al 0.9% y Tween 20 al 0.05%) facilitó la colección de un precipitado (pellet) bacteriano limpio y en abundancia mediante centrifugación (Figura 8). Tiempos prolongados de centrifugación, mayores de treinta 30 minutos, así como el número de centrifugaciones, mayor a 3, favorecieron la ruptura de las células bacterianas y la consiguiente disminución de la cantidad del precipitado bacteriano obtenido.



Nótese la gran cantidad de bacterias obtenida.

El uso del kit Qiaamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) permitió obtener ADN de elevada calidad y cantidad. Se obtuvo ADN genómico bacteriano de una concentración y calidad adecuada (Figura 9).

La concentración de ADN bacteriano estuvo comprendido entre 70 ng/μl y 140.5 ng/μl con una media de 100.5 ng/μl. El volumen de re suspensión total fue de ADN fue de 200μl con lo cual se obtuvo un total de 20.14 microgramos de ADN bacteriano.

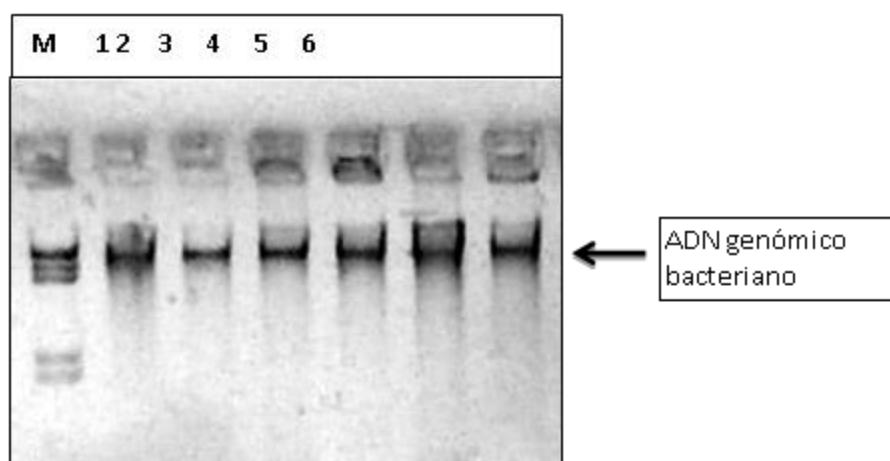


Figura 9. Extracción de ADN genómico bacteriano a partir de licor ruminal (dilución 1:10). Gel de agarosa al 1% TBE 0.5X, 40 V por 40 minutos. Pozo 1-6. ADN genómico bacteriano. M marcador de peso molecular Lambda Hind III (Fermentas) (100 μg).

3. Amplificación del gen 16S ARNr mediante PCR

Previo a la amplificación del gen 16S ARNr se realizó la estandarización de las condiciones y ciclos termales de la PCR a partir de las condiciones descritas por Pryde y col., 1999. Se procedió a estandarizar específicamente la concentración de $MgCl_2$, por ser este un cofactor primordial para la actividad de la enzima ADN polimerasa y la temperatura de alineamiento por ser la temperatura a la cual alinean los cebadores con sus secuencias complementarias en el ADN molde. Se probaron concentraciones crecientes de $MgCl_2$ (1.5, 2.0, 2.5 mM), encontrándose que la concentración óptima fue de 2.0 mM; así mismo se probaron 3 temperaturas de alineamiento distintas (55, 57 y 59°C), encontrándose que 57°C fue la temperatura óptima. A esta concentración y temperatura se

pudo apreciar la presencia de un producto de amplificación único y de alta concentración.

La técnica de PCR estandarizada permitió la amplificación de un amplicón único de aproximadamente 728 bp correspondiente a un fragmento del gen 16S ARNr a partir de un mezcla (pool) de ADN genómico bacteriano (Figura 10).

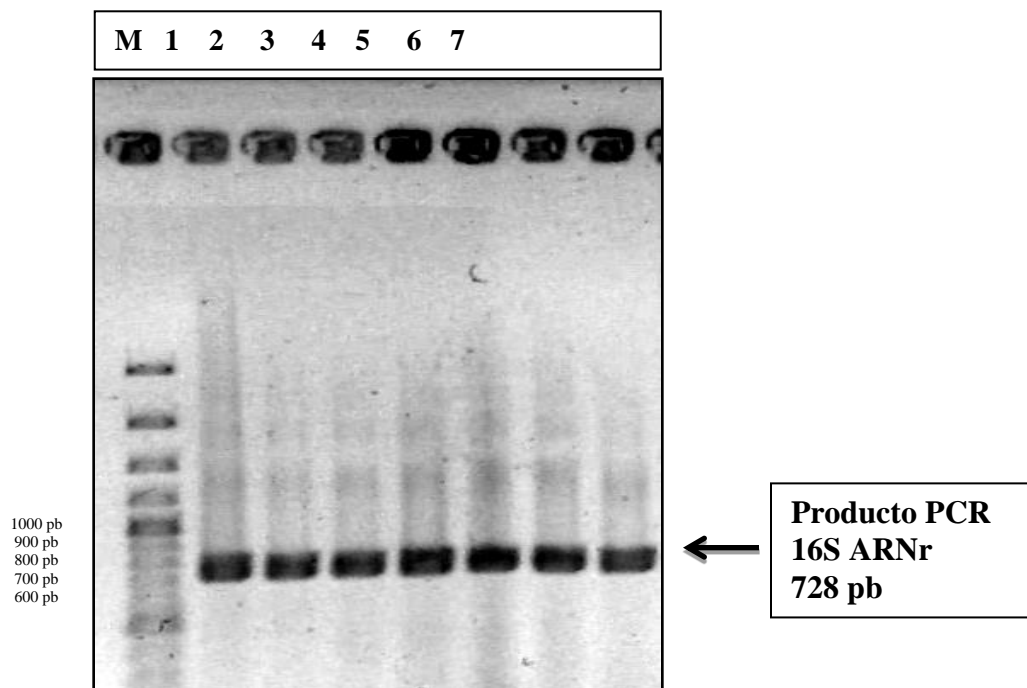


Figura 10. Amplificación de PCR del gen 16S rDNA a partir de ADN bacteriano proveniente del compartimiento 1 (CI) de alpaca. Gel de agarosa al 2% TBE 0.5X, 40 V por 90 minutos.

Pozo 1-7. PCR producto gen 16S rDNA, M marcador de peso molecular 100 bp plus (Fermentas).

4. Clonamiento del gen 16S ARNr bacteriano

Los productos de PCR fueron purificados para eliminar el exceso de dNTPs y cebadores como medida para garantizar un clonamiento efectivo tal lo recomendado por Abecia y col., (2005). Se utilizaron células competentes JM 109 disponibles en el kit de clonamiento, se empezó con una relación de inserto/vector 1:3 recomendado por el fabricante, sin embargo se apreció un crecimiento exagerado sin la capacidad de aislar colonias individuales, por lo cual se decidió modificar la relación a 1:1 (Figura 11).

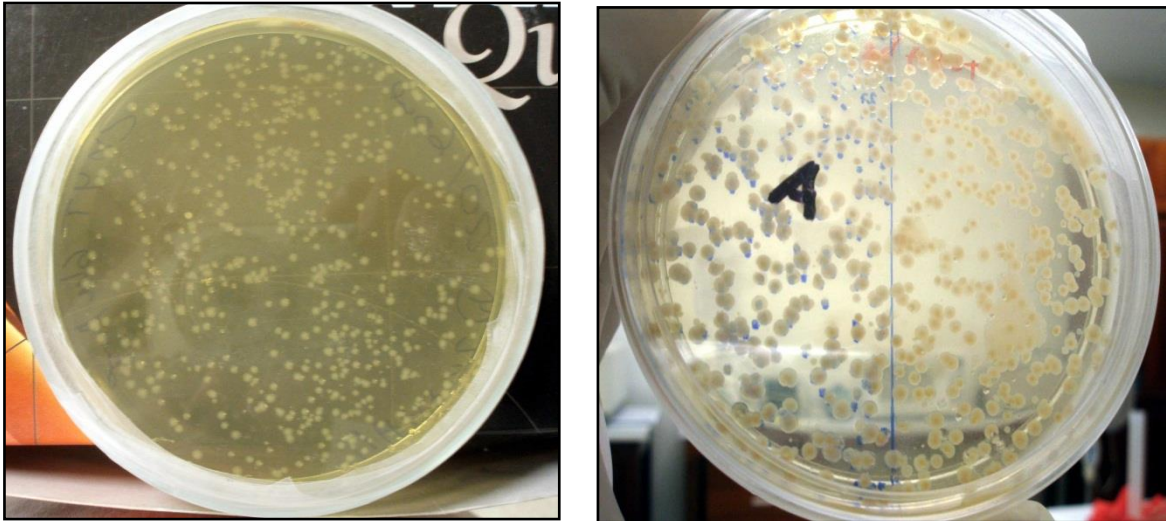


Figura 11. Clonamiento de productos de PCR del gen 16S ARNr. Cultivo de *E. coli* JM109 de 24 horas. Nótese la separación de las colonias en la placa de cultivo.

La técnica de selección mediante cultivo en medio LB (Luria Broth) con ampicilina y α - complementación de β -galactosidasa mediante el uso de análogos de glucosa X-Gal e IPTG (método de selección azul y blanca) demostró una adecuada efectividad (Figura 12).

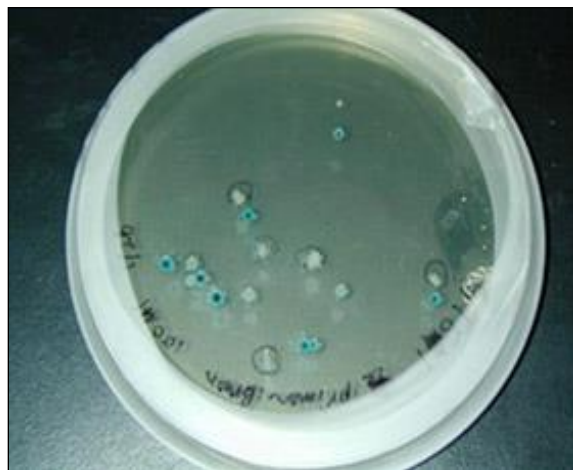


Figura 12. Técnica de selección mediante cultivo en medio LB (Luria Broth) con ampicilina y α - complementación de β -galactosidasa mediante el uso de análogos de glucosa X-Gal e IPTG (método de selección azul y blanca). Las colonias que han recibido el vector con inserto presentaran coloración blanca a diferencia de las colonias que no han recibido el vector que presentan coloración azul.

5. Análisis de secuencias del gen 16S ANR e identificación bacteriana

Un total de 24 secuencias únicas de un fragmento de 728 bp del gen 16S ARNr fueron obtenidas a partir de 50 colonias picadas y secuenciadas. El análisis de las 24 secuencias únicas del gen 16S rDNA permitieron la identificación de bacterias en base a la identidad de secuencias, e-value y a origen filo genético (Mignard y Flandrois, 2006). La confiabilidad de las secuencias fue asegurada mediante secuenciamiento en ambas direcciones (Figura 13).

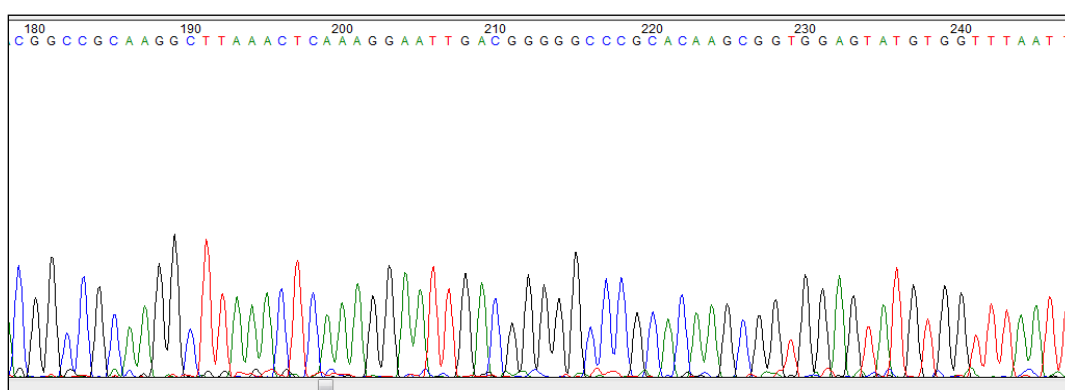


Figura 13. Cromatograma de la secuencia del gen 16S ARNr de *Succiniclasticum ruminis*.

Nótese la calidad de la secuencia obtenida.

Se identificaron 6 especies bacterianas previamente descritas en bases de datos del GeneBank, Blast Server For Bacterial Identification, Ribosomal database Project y BiBi database: *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus bromi*, *Clostridium thermocellum*, *Succiniclasticum ruminis*, *Sporobacter termitidis* y *Fastidiosipila sanguinis*. Los valores de identidad de las secuencias, valores de estadístico e (e-value) y número de secuencias se detallan en las tablas 1 y 2. Las relaciones filo genéticas de las especies identificadas se detallan en el anexo 4.

Cuadro 1. Número de clonas y especies bacterianas identificadas mediante análisis de 3 bases de datos de secuencias del gen 16S ARNr.

BACTERIA	Nº SECUENCIAS	BLAST SERVER	RIBOSOMAL DATABASE PROJECT	BIBI DATABASE
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	4	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Ruminococcus sp.</i>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>
<i>Ruminococcus bromi</i>	5	<i>Ruminococcus bromi</i>	<i>Ruminococcus sp.</i>	<i>Ruminococcus bromi</i>
<i>Clostridium thermocellum</i>	5	<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Clostridium sp.</i>	<i>Clostridium thermocellum</i>
<i>Succiniclasicum ruminis</i>	8	<i>Succiniclasicum ruminis</i>	<i>Succiniclasicum sp.</i>	<i>Succiniclasicum ruminis</i>
<i>Sporobacter mitidis</i>	1	<i>Sporobacter mitidis</i>	<i>Sporobacter sp.</i>	<i>Sporobacter mitidis</i>
<i>Fastidiosipila sanguinis</i>	1	<i>Fastidiosipila sanguinis</i>	<i>Fastidiosipila sp.</i>	<i>Fastidiosipila sanguinis</i>
TOTAL	24			

Cuadro 2. Especies bacterianas identificadas, número de secuencias, porcentaje de identidad y valor estadístico E (e-value).

ESPECIE BACTERIANA IDENTIFICADA	Nº SECUENCIAS	IDENTIDAD DE SECUENCIA (%)	E-value
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> AM915271	4	95	e^{-166}
<i>Ruminococcus bromi</i> DQ882649	5	95	e^{-174}
<i>Clostridium thermocellum</i> CP000568.RR3	5	95	e^{-141}
<i>Succiniclasicum ruminis</i> X81137	8	98	0
<i>Sporobacter mitidis</i> Z49863.16S-RRNA	1	95	e^{-147} e^{-156}
<i>Fastidiosipila sanguinis</i>	1	95	
TOTAL	24		

V. DISCUSION

En ecosistemas bacterianos complejos caracterizados por la presencia de más de 500 a 1000 especies diferentes, solo un limitado número de especies pueden ser cultivadas e identificadas. Se estima que entre un 10% a un 20% de las bacterias del tracto gastrointestinal tienen la potencialidad de ser cultivables, sin embargo esta capacidad estará influenciada por su proporción en la biomasa y sus requerimientos nutricionales y de cultivo (Apajalahti y col., 2003). Además, deficiencias en los métodos de identificación fenotípica han sido reportados para diferentes especies bacterianas (Mignard y Flandrois, 2006) como *Streptococos*, *Campylobacter* entre otros. Las técnicas moleculares como el secuenciamiento y análisis del gen 16S ARNr constituyen técnicas de elección para la identificación de microfloras a partir de ecosistemas complejos, debido a su eficiencia, costo y rapidez en la obtención de resultados en comparación con las técnicas de cultivo tradicional (Mignard y Flandrois, 2006).

El presente estudio demostró la viabilidad del uso de técnicas moleculares para la identificación de bacterias presentes en el compartimiento 1 de la alpaca, el uso de kits comerciales para extracción de ADN basado en captura de ADN en membranas de silica (Qiaamp DNA stool mini kit - Qiagen) demostró la capacidad de aislamiento de ADN genómico de alta calidad y en una cantidad adecuada para estudios genéticos (Figura 9). El uso de una ADN polimerasa recombinante con unión a una proteína en su sitio activo (HotStart DNA polymerase -Qiagen) demostró la capacidad de amplificación de un amplicon único altamente específico y de una alta concentración aun utilizando un limitado número de ciclos en la PCR (Figura 10). El uso de protocolos estándar para clonamiento y secuenciamiento automático (pGEMT easy - Promega) demostraron su utilidad para la identificación de especies bacterianas (Figura 11, 12 y 13) a partir del análisis de secuencias ribosomales tal lo reportado en otros estudios realizados (Abecia y col., 2005; Pérez de Rozas y col., 2004).

La comparación con bases de datos disponibles de genes ribosomales permite la identificación rápida y fácil de una secuencia obtenida a partir del clonamiento al azar, sin embargo, aún no hay un acuerdo universal sobre el porcentaje de similitud en la identificación de una secuencia, algunos niveles de corte sugieren un 95-97% de identificación para género y 99% para especie (Mignard y Flandrois, 2006). Sin embargo, la comparación de genomas y no sólo la comparación del gen 16S ARNr indican con exactitud la identificación molecular a nivel de especie en bacterias. Diferentes autores en base a estudios comparativos de re asociación de moléculas de ADN, análisis fenotípico e identidad de secuencia para el gen 16S ARNr podrían no obtener resultados similares (Stackebrandt y Goebel, 1994). Por ello, en taxonomía, actualmente se recomienda la identificación polifásica, que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación.

Dentro de las técnicas de identificación molecular basadas en identidad del gen 16S ARNr, el uso de árboles filogenéticos permiten obtener una mayor certeza en los resultados de identificación (Abecia y col., 2005).

En este estudio se utilizó como punto de corte para la identificación de especie un 95% de identidad en secuencia y una identificación filogenética para las 6 especies identificadas (Mignard y Flandrois, 2006). La calidad de las secuencias obtenidas (Figura 13), el secuenciamiento por ambas hebras permitió una identificación molecular correcta en base a una aproximación de identidad y análisis filogenético utilizando el BiBi Database, Blast server y RPB database, base de datos de genes ribosomales bacterianos los cuales cuentan con un gran número de secuencias del gen 16S ARNr (Mignard y Flandrois, 2006).

El presente estudio constituye un reporte preliminar de las especies bacterianas presentes en la microbiota bacteriana del compartimiento 1 de la alpaca. Los resultados sugieren la presencia de *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus bromi*, *Clostridium thermocellum*, *Succiniclasicum ruminis*, *Sporobacter termitidis* y *Fastidiosipila sanguinis*, en base al análisis del gen 16S ARNr. Si Así mismo, confirman la presencia de los géneros *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Succiniclasicum*,

Sporobacter y *Fastidiosipila* similar a lo reportado en otras especies de rumiantes como vacunos (Uyeno y col., 2010; Huws y col., 2010; Pei y col., 2010).

Estudios en ganado bovino reportan la presencia de microorganismos del *phylum Firmicutes* que incluye al género *Clostridium*, un anaerobio estricto como predominantes en las comunidades microbianas de la pared ruminal, y a microorganismos del *phylum Bacteroidetes* como los microorganismos más predominantes en las comunidades microbianas del contenido ruminal, siendo los *phylum Fibrobacteres*, *Planctomycetes*, y *Verrucomicrobia* únicos para microflora bacteriana ruminal (Zhou y col., 2011; Huws y col., 2010).

Estudios de identificación de microbiota realizados en ganado bovino mediante generación de bibliotecas de genes 16S ARNr reportan la presencia de al menos 32 géneros comprendidos en 19 familias y 9 *phylum* identificados mediante el secuenciamiento de 1014 clonas (Kong y col., 2010). Nuestros resultados han identificado 5 géneros con un total de 50 clonas secuenciadas, lo cual nos da un estimado de un género identificado por cada 10 clonas, lo cual en comparación con los resultados obtenidos por Kong y col. (2010) con valores de un género cada 30 clonas secuenciadas demuestra la viabilidad de la aproximación molecular para la identificación de bacterias para el compartimiento 1 de la alpaca.

El género *Ruminococcus*, específicamente las especies *R. flavefaciens* y *R. bromi*, son microorganismos anaerobios, gram positivos que pertenecen a la clase clostridia, la cual ha sido reportada en ecosistemas ruminales en ganado bovino (Huws y col., 2010).

La clase *Clostridia*, específicamente el género *Clostridium* constituye uno de los géneros más abundantes en la microflora ruminal en ganado bovino (Zhou y col., 2010). El *Clostridium thermocellum* es una bacteria anaerobia, termofílica que ha adquirido un gran interés biotecnológico debido a sus propiedades celulolíticas y etanol génicas (Freier y col., 1988).

La alpaca posee una gran capacidad de digestión de forrajes de baja calidad y con grandes contenidos de celulosa. El componente microbiano del compartimiento 1 de alpaca, principal cámara de fermentación de forraje, podría estar involucrado en la presentación de esta característica. La identificación de *C. thermocellum* en alpacas provee información acerca de la existencia de bacterias celulolíticas como componentes de la microflora bacteriana del compartimiento 1, las cuales podrían tener una importancia biotecnológica. Estudios posteriores podrían determinar la presencia de variantes para esta especie y la búsqueda de asociación con el potencial celulolítico.

Otros géneros bacterianos de la clase *Clostridia*, identificados en alpacas corresponden a los géneros *Succiniclasicum*, *Sporobacter* y *Fastidiosipila*. *Succiniclasicum ruminis*, es una bacteria Gram negativa, anaeróbica que fermenta el succinato hasta propionato comúnmente encontrada en contenido ruminal en ganado bovino alimentado con forraje debido principalmente a su gran número (van Gylswyk, 1995) en contraste con la bacteria *Sporobacter termitidis*, esta bacteria anaerobia previamente identificada en termitas cumple una función de digestión de la lignina celulosa encontrada en madera, sin embargo no ha sido reportada en ganado bovino (Grech-Mora, 1996). La *Fastidiosipila sanguinis* es un microorganismo gram positivo, anaerobio y/o micro aerófilo de difícil cultivo aislado de sangre de ratas y humanos no reportado en ganado bovino (Falsen y col., 2005).

Los resultados obtenidos en este estudio constituyen el primer reporte de especies bacterianas presentes en el compartimiento 1 de la alpaca adulta en Perú, sugiriéndose continuar con el secuenciamiento de un número más elevado de clones para asegurar una representatividad de las diferentes especies bacterianas que habitan dicho nicho ecológico.

VI. CONCLUSIONES

La identificación bacteriana basada en la amplificación, secuenciamiento y análisis filogenético del gen 16S ARNr demostró ser una técnica altamente específica y confiable.

Se identificaron 6 especies bacterianas previamente descritas en bases de datos del GeneBank, Blast Server For Bacterial Identification, Ribosomal database Project y BiBi database: *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus bromi*, *Clostridium thermocellum*, *Succiniclasicum ruminis*, *Sporobacter termitidis* y *Fastidiosipila sanguinis* como constituyentes de la microflora bacteriana del compartimiento 1 de la alpaca.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda el secuenciamiento de un número mayor de clonas a partir de la genoteca de gen 16S ARNr elaborada para obtener una representatividad de las especies bacterianas presentes en el compartimiento 1 de la alpaca.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Abecia L., Fondevila M., Balcells J., Edwards J., Newbold J., McEwan N. 2005. Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Letters* 244: 111-115.

Aert R., Voet M., Van Campenhout S., Vander Stappen J., Volckaert G. 1998. Polymerase chain reaction. In *Molecular tools for screening biodiversity plants and animals*. Edit. Karp, A Isaac P, Ingram D. Chapman y Hall. London: 111- 118.

Apajalahti J., Kettunen A., Paivi H., Hanna J., y Holben W. 2003. Selective Plating Underestimates Abundance and Shows Differential Recovery of Bifidobacterial Species from Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(9) p 5731-5735.

Bauer MA., Anderson JB., Cherukuri PF., De Weese-Scott C. 2005. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Oxfords Journals. Nucleics Acids Reserch*. 33: 192 - 196.

Berg RD. 1996. The indigenous gastrointestinal microbiota. *Trends in Microbiology*. 4(11): 430 - 435.

BIBI, A Bioinformatics Bacterial Identification Tool. 2003.G. Devulder, G. Perrière, F.

Baty and J. P. Flandrois. *J. Clin. Microbiol.* April vol. 41 no. 4 1785-1787.

Blast server for the identification of procaryotes. [Internet], [21 octubre 2012], Disponible en: www.bioinfo.unice.fr/blast.

Brown T. 2000. The polymerase chain reaction. In *Essential molecular biology. A practical approach*. Edit T.A. Brown. Vol 1. 2ª Edición. Oxford University Press. Oxford - UK: 89-120.

Cole B., Chai J., Farris Q., Wang S. A., Kulam D.M., McGarrell G.M., Garrity and Tiedje J.M. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. Oxford Journals. Life Sciences. Nucleic Acids Research. 33(1): 294-296.

CONACS. Crispín M. 2003. Población de Alpacas por departamentos. Productividad y distribución de fibra de alpaca en la región de Huancavelica: un análisis comparativo entre Huancavelica y Puno Programa de Camélidos domésticos. Lima-Peru. 39

D'Ambrosio E., Pascale E. 1999. DNA extraction from mammals. In: Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR. Edit. Micheli M. Bova R.. Springer. Germany: 15:20.

Dale J. Y. von Schantz M. 2002. From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology. John Wiley y Sons, Ltd. Alemania: 358.

Dale J., Park S. 2004. Molecular Genetics of Bacteria. 4° Edición. John Wiley and Sons. Reino Unido: 346 pags.

Derrien M., Vaughan E.E., Plugge C.M. and de Vos W.M. 2004. Akkermansia mucinophila sp. A human intestinal mucin-degrading bacterium. Journal S. Evolution Microbiol 54: 1469-1476.

Dunham I. 2005. Genome sequencing. In: Encyclopedia of life sciences. John Wiley and Sons Ltd.

Etherton T. 2003. Mejoramiento de la Ganadería Mediante Biotecnología. Conferencia. Universidad Estatal de Pensilvania.

Falsen E., Collins M., Welinder-Olson C., Song Y. Finegold, Lawson P. 2005. Fastidiosipila sanguinis gen. nov, sp. nov. A new Gram-positive, coccus-shaped organism from human blood IJSEM. 55,(2):853-858.

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2004. Commission on genetic resources for food and agriculture. Third section. Measurement of domestic animal diversity. CGRFA/WG-AnGR- 3/04/Inf. 3.

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina (TCP/RLA/2914): 1-62.

Ferguson, L. 2007. Nutrigenomics and Gut Health. Mutation Research 622:1-6

Freier D., Mothershed C., Wiegel J. 1988. Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. Applied and Environmental Microbiology. 54, (1):204-11.1-9.

Gauch S., Hermann R., Feuser P., Oelmiiller U., Bastian H. 1998. DNA extraction using anion-exchange chromatography and silica-gel based membranes. In Molecular tools for screening biodiversity plants and animals. Edit. Karp A., Isaac P., Ingram D., Chapman y Hall. London:53-63.

Grech-Mora I., Fardeau M., Patel B., Olliver B., Rimbault A., Prensier G., Garcia J., Gamier-Sillam, E. 1996. Isolation and Characterization of *Sporobacter tennitidis* gen.nov.sp.nov. From the Digestive Tract of the Wood-Feeding *Termite Nasutitermes lujae*. International Journal Of Systematic Bacteriology. 46,(2):512-518.

Gu J. and Reddy R. 2001. Cellular RNAs: Varied Roles. In: Nature Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing.

Hardin SH. 2001. DNA sequencing. In: Encyclopedia of life sciences. Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group.

Huws S.A., Lee M.R., Muetzel S.M., Scott M.B., Wallace R.J., Scollan N.D. 2010. Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. *FEMS Microbiol Ecol.* 73, (2):396-407.

Karcher S. 1995. *Molecular biology. A project approach.* Academic Press. USA: 45-134,215-227.

Klug y Cummings, 1997. *Concepts of genetics.* 5th edition. Prentice Hall Inc. USA.

Kong Y., Teather R., Forster R. 2010. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiol Ecol.* 74, (3):612-22.

Linaje R., Coloma M.D., Pérez-Martínez G., Zúñiga M. 2004. Characterization of faecal enterococci from rabbits for the selection of probiotic strains. *J Appl Microbiol.* 96. 4:761-71.

Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. 2000. Structure of nucleic acids. In: *Molecular cellular biology.* 4th ed. W.H. Freeman. New York.

Makkar H. y McSweeney C. 2005. *Methods in gut microbiol ecology for ruminants.* Springer. USA: 163-177.

Mignard S. y Flandrois J. 2006. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods* 67: 574-581.

Narins B. 2003. *World of Microbiology and immunology.* Thompson y Gale. USA: 51-54

Ness B. and Knight J. 2004. *Encyclopedia of genetics.* Revised edition. Vol. 1. Salem Press. Nueva Jersey: 54-60.

Patel, J.B. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* 6:313-321.

Pérez de Rozas, A.M., Roca, M., Carabaño, R., de Blas, C., Francesch, M., Brufau, J., Martín-Orúe, S.M., Gasa, J., Campoy, S., Barbé, J., and Badiola, I. 2004. A comparative study of intestinal microbial diversity from birds, pigs and rabbits by restriction fragment length polymorphism analysis. *Reprod Nutr. Dev.* 2004; 44: S4

Pryde Susan E., Anthony J., Richardson, Colin S. Stewart, and Harry J. Flint.1999. Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen and cecal lumen of a pig. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5372-5377.

RDP (Ribosomal Data Project) 1992. [Internet], [21 octubre 2012]. Disponible en <http://rdp.cme.msu.edu>.

Robinson D., Lafleche G. 2000. Nucleic Acid electrophoresis in agarose gels. In *Essential molecular biology. A practical approach*. Edit T. Brown. Vol 1. 2ª Edición. Oxford University Press. Oxford - UK: 89-120.

Rosmini M.R., Sequeira G.J., Guerrero L., Marti L.E., Dalla S., Frizzo L. y Bonazza J.C. 2004. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 3: 187-197.

Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., and Lee, Y.K. 1999. Probiotics: How should they be defined? *Trends Food Sci. Technol.* 10: 107–110.

Sambrook J., Maniatis T., Fritsch J. 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. NY-USA: pag.

Schiere J. y Tamminga S. 1996. Assessment of Biotechnology in Animal Nutrition. Biotechnology and development monitor. 27:9-11.

Stakebrandt E. and Goebel B.M.1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol 44:846-9.

Tajima K., Aminov R., Nagamine T., Ogata K., Nakamura M., Matsui H., Benno Y. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. FEMS Microbiology Ecology 29:159-169

Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.

Tang M., Pham P., Shen X., Taylor J.S., O'Donnell M., Woodgate R. y Goodman M.F. 2000. Roles of E. coli DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. Nature. 404: 1014-1018.

Tellez G., Higgins S.E., Donoghue A.M. y Hargis B.M. 2006. Digestive Physiology and the Role of Microorganisms. Department of Poultry Science, Center of Excellence for Poultry Science, and USDA-ARS-PPPSRU, University of Arkansas, Fayetteville 72701.

Uyeno Y., Sekiguchi Y., Kamagata Y. 2010. rRNA-based analysis to monitor succession of faecal bacterial communities in Holstein calves. Lett Appl Microbiol. 51, (5):570-577.

Van Gylswyk NO. 1995. *Succiniclasticum ruminis* gen.nov.sp.nov. A ruminal bacterium converting succinate to propionate as the sole energy-yielding mechanism. *Int J Syst Bacteriol.*45(2):297-300.

Vanhoutte T., Huys G., De Brandt E., Fahey G.C. Jr, Swings J. 2005. Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. *FEMS Microbiol Lett.* 249. 1:65-71.

Wilton S. 2002. Dideoxy sequencing of DNA. In: *Encyclopedia of life sciences*. Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group.

Zhou L., Adamowicz E., Basarab J., Guan L. 2011. Characterization of bovine ruminal epithelial bacterial communities using 16S rRNA sequencing, PCR- DGGE, and qRT-PCR analysis. *Vet Microbiol*, doi: 10.1016/j.vetmic.2011.08.007.

Zoetendal E.G., Collier C.T., Koike S., Mackie R.I., Gaskins H.R. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr.* Feb;134(2):465-72.

IX. ANEXOS

ANEXOS 01

- a. A 2 ml de pellet bacteriano se adicionan 8 ml de buffer ASL (Buffer de lisis celular) logrando una muestra de 10 ml.
- b. Homogenizar fuertemente
- c. Llevar a una temperatura de 95°C por 30 minutos, con esto lograremos inactivar proteínas y lisar células.
- d. Centrifugamos por 2 minutos.
- e. Recolectar el sobrenadante en un tubo nuevo y en el fondo del tubo se observa el pellet bacteriano formado.
- f. Se agregan 2 pastillas del Kit en cada tubo y vortexeamos
- g. Incubamos a temperatura ambiente por 05 minutos
- h. Centrifugar por 02 minutos a máxima velocidad para lograr un pellet de toxinas y proteínas y liberar el ADN.
- i. Centrifugar en un tubo nuevo por 03 minutos.
- j. Por cada 1.5 ml de muestra (Sobrenadante) agregamos 15ul de Proteinasa K y vortexeamos.
- k. Agregamos igual volumen de muestra de buffer AL para completar la lisis y el resultado se divide en 4 tubos de 3 ml, vortexear (VOLUMEN / VOLUMEN)
- l. Sellar con parafina cada uno de los tubos e incubar a 70°C por 20 minutos.
- m. Refrigerar a -4°C
- n. Agregamos 3 ml (1 VOLUMEN) de Etanol al 100% para lisar las células, deshidratar el ADN ya que esta solvatado (OH captura el AGUA)
- o. Trasvasamos 500ul de la solución en las 4 columnas para capturar el ADN el cual se va a fijar al Sílice
- p. Pasamos a la microcentrífuga las bandas por un tiempo de un minuto, descartando el filtrado y volviendo a agregar 500ul en cada columna
- q. Lavamos con el buffer AW1 (Buffer que contiene etanol) el cual va a lavar la membrana de Sílice. Lavamos 3 veces con 500ul en cada lavado que se realice en cada banda

- r. Lavamos con el buffer AW2(Buffer de lavado final)
- s. Centrifugamos después de cada lavado
- t. Centrifugamos el tubo por 1 minuto sin ningún buffer.
- u. Centrifugamos por 3 minutos de la misma manera
- v. Resuspendemos con 100µl de buffer AE, después lo volvemos a centrifugar nuevamente por un minuto
- w. Lo rotulamos y lo congelamos a -20°C.

ANEXO 02

Protocolo de amplificación del Gen Bacteriano 16S ARNr

Materiales:

- Buffer PCR
- dNTP_s
- MgCl₂
- PF16S
- PR16S
- Taq DNApol
- H₂O PCR
- DNA de bacterias cecales de cuyes

Equipos:

- Termociclador
- Pipetas
- Tips
- Láminas de Parafina
- Pocillos del termociclador

Observaciones:

- Se realizó la dilución de los cebadores 16S rDNA-787 F (Primer de Avance) y del 16 S rDNA-1515 R (Primer de reversa) PA-Mod (59 CGCGCCGCATTAGATACCCTDGTAG

TCC 39 [Escherichia coli posición 787 hasta 814]) y PR (59 GCGGCCGCTACCTTGTTA
CGACTT 39 [Escherichia coli posición 1515 hasta 1492]) (Pryde y col., 1999).

- Se calculó siempre un poco más de la necesaria para compensar los errores inevitables de pipeteo.
- Previamente hay que realizar un esquema de la preparación.
- Alicuotar cada uno de los reactivos.

Preparación de Mix de PCR

Reactivos

Volumen final= 20 µl

Componente de PCR	Concentración Final	Concentración Inicial	Volumen Inicial
Buffer PCR	1x	5X	4 µl
dNTP _s	0.15 mM	20mM	1.5 µl
MgCl ₂	2.0 mM	25 mM	1.6 µl
PF16S	5 pmoles	20 pmol/µl	0.25 µl
PR16S	5 pmoles	20 pmol/µl	0.25 µl
Taq DNApol	1U/µl	5 U/µl	0.20 µl
H ₂ O PCR			10.2 µl
Total			18 µl

Añadir 2 µl DNA

Volumen final= 20 µl

CONTROLES: Negativo 2 µl H₂O PCR

ANEXO 03

Protocolo de Clonamiento y transformación Bacteriana

- Descriopreservar las células competentes JM 109 en hielo
- Tomar 50 µl de células competentes y transferir en un tubo estéril
- Tomar el producto ligado (inserto más vector) y transferir al tubo que contiene las células competentes.
- Agitar suavemente
- Incubar en hielo por 30 minutos
- Realizar un shock térmico a 42°C por 90 segundos
- Nuevamente llevar a hielo por 2 minutos
- Centrifugar a máxima velocidad por 20 segundos
- Descartar el sobrenadante
- Agregar 700 µl del medio SOC y mezclar suavemente con la pipeta, luego agregamos Cl^2Mg y glucosa.
- Incubar a 37°C en agitación por una hora
- Centrifugar por 30 segundos a máxima velocidad
- Descartar el sobrenadante
- Resuspender el pellet en 50 µl de Luria Broth sin antibiótico
- Agregar al tubo anterior:
 - 35 µl de IPTG (100 mM)
 - 10 µl de xgal Mezclar
- Del tubo anterior tomar todo el volumen y agregar a la placa estéril que contiene agar más Ampicilina
- Mezclar uniformemente con el rastrillo sin dañar el agar
- Incubar toda la noche a 37°C.

Selección de colonias recombinantes por miniprep

- Seleccionar una colonia a partir de la placa obtenida e inocular en caldo LB/Ampicilina. Inocular a 37°C por toda la noche con movimiento constante.
- Transferir 1.5 ml de cultivo a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos. Descartar el sobrenadante. Repetir este paso una vez más.
- Añadir 100 µl de buffer I al pellet, re suspender con ayuda de un vortex.
- Dejar en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Agregar 200 µl de buffer II preparado en el momento. Mezclar suavemente por inversión.
- Dejar reposar 5 min a temperatura ambiente
- Agregar 150 µl de buffer III. Mezclar suavemente por inversión y colocar en hielo por 10 minutos.
- Centrifugar a 12000 g por 10 minutos a 4 C y transferir el sobrenadante a un tubo de reacción nuevo.
- Agregar 500 µl de isopropanol. Agitar el tubo con la ayuda de un vortex y colocarlo en hielo por 10 minutos
- Centrifugar el tubo a 14000 rpm durante 10 minutos a 4C. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet agregando 1 ml de Etanol 70 %. Eliminar el sobrenadante y dejar secar 37C durante 10 minutos.
- Resuspender el ADN en 50 µl de H₂O tri destilada estéril.
- Analizar 5 µl de ADN plasmídico en un gel de agarosa al 1 %

VISUALIZACION: los productos de PCR de las colonias recombinante son colocadas en un sistema de electroforesis en geles de agarosa y al ser teñidos con bromuro de etidio pueden ser visualizados en una cámara de luz ultravioleta.

Medio SOC (100ml)

2.0 gr Bacto – Tryptosa

0.5 gr Bacto -Extracto de Levadura

1mLNaCl1M

0.25 mL KCl 1M

1 mL Mg 2T 2M Stock

Adicionar Bacto Tryptosa, Bacto-Extracto de Levadura, NaCl, KCl a 97 ml de agua destilada.

Agitar bien para disolverlo completamente, posteriormente auto clavar y mantener a temperatura fría, luego adicionar el stock de Mg²⁺ 2M y glucosa 2M para obtener una concentración final de 20mM. Llevar a 100 mL con agua destilada estéril y filtrar